

## 乳酸菌 및 酵母菌에 對한 化學物質의 放射線殺菌協力作用에 關한 研究

“D.H.A., Sorbic acid, 및 Menadion 의 協力作用에 對하여”

金鍾協 · 全世烈

(原子力研究所 · 生物學研究室)

### Studies on synergistic actions of some chemicals on radiation sterilization of *Lactobacillus* and yeast.

“Synergistic actions of D.H.A., Sorbic acid and Menadion.”

Kim, Jong Hyup., and Chun. Sae Yul.

(Atomic Energy Research Institute, Div. of Biology.)

#### Abstract

The synergistic actions of certain antimetabolic agents for *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* on radiation sterilization have been studied.

The used chemical agents are sorbic acid, vitamin-K<sub>3</sub>, dehydroacetic acid, p-oxybutyl benzoate and nitrofurazone, those are the permitted as food preservatives.

Experimental results are as following,

- 1) Survival fraction of yeast which was gamma-irradiated and influenced by sorbic acid or vitamin K<sub>3</sub> is much reduced than that of only irradiated respectively.
- 2) It seems like that the used chemicals acts synergistically on radiation sterilization. Sodium-dehydroacetate and p-oxybutyl benzoate are proved to be also synergistic but weakly.
- 3) Survival fraction of *Lact. plantarum* which was gamma-irradiated and influenced by sorbic acid, dehydroacetic acid or nitrofurazone respectively much reduced than that of only irradiated group, it can be estimated as synergistic action of chemical affected on radiation sterilization.
- 4) It was found that nutrient componets can affect radiation sterilization of microorganisms protectively.

#### 結 論

Gamma-ray 의 殺菌作用에 關해서는 이미 Hollander(1955 年)氏에 依하여 널리 紹介되고 있으며, 이 gamma-ray 로써 農水産製品, 醫藥品等の 殺菌을 이룩하려는 研究가 各國에서 活潑히 進行되고 있다. (Brown, 1960, Lerke, 1960, Matsuyama, 1966, Meshitsuka, 1963)

大體로 食品에 對해서는 種類에 따라서 照射量의

限界가 0.25 M. rad 로부터 3.0 M. rad 까지 있으나, 實際로는 0.3 M. rad 程度에서 惡臭와 色變現象이 일어나므로 放射線의 食品工業에의 利用은 相當한 隘路를 內包하고 있는 것이다. (Grosch, 1965)

따라서 可及的 低線量(0.5 M. rad 以下이며는 無難하다)으로서 殺菌效果를 最大限으로 얻으려는 努力이 研究面에 反映되고 있다. (Brown, 1960, Eldjarn, 1960, Koch, 1957, Wilson, 1960).

其中에서도 加熱處理를 통한 物理的方法은 Kempe,

1960年, 氏等에 의하여 成功의이었으며, 化學的方法으로서는 増感劑, 殺菌協力劑의 檢索方向으로 研究가 進行되고 있다. (Matsuyama, 1960~1966, Meshitsuka 및 Oka, 1963~1966).

한편 우리나라에서는 李敏載(1965~1966)氏 等에 의하여 増感劑의 檢索研究가 있다.

以上の 諸氏에 의하여 使用된 化學物質의 種類를 보면은 Antibiotics, Sodium chloride, Organic acids, Ferric compounds 等이 있으며, 食品工業에 適用이 可能な 物質과 不適當한 物質이 있다.

本研究에 있어서는 許可된 食品保存劑인 Sorbic acid, Dehydroacetic acid, Para-oxybutylbenzoate, Vitamin K<sub>3</sub>, 및 Nitrofurazon을 使用하여 乳酸菌과 酵母菌에 對한 放射線殺菌協力作用을 究明코저 하였다.

Sorbic acid와 Dehydroacetic acid는 그 作用機作이 알려져 있으나(York, 1964, Nomoto, 1954) 電離放射線인 gamma-ray의 生物學的作用方式과 이들 化學物質이 어떠한 聯關性을 갖고 있는가를 究明함이 最終의 目標인 것이다.

本研究遂行에 있어서 指導하여 주신 李敏載教授(서울大學校), 李根培博士(原子力研究所)께 感謝를 드리며, 많은 助言을 하여준 松山晃, 岡充 兩博士께 深甚한 謝意를 표합니다.

### 實驗材料 및 方法

1. 菌株; *Lactobacillus plantarum* 및 *Saccharomyces cerevisiae*를 使用하였으며, *Sacch. cerevisiae*는 Diploid cell이 있다.

2. 放射線源 및 線量率; Cobalt-60, gamma irradiator를 使用하였으며, 線量率은 1m 距離에서 1320 Curie/hr. 이고 이 線量은 1,000 Curie의 線源에서 放出되었다.

3. 照射方法; 化學物質과 培養液(培地)의 混合液을 試驗管에 一定量式 넣고 微生物의 生理食鹽水懸濁液을 pipet 로서 一定量式 注入 한後 放射線線源에 密着시켜 該當線量を 照射하였다.

4. 生殘率의 算定; 照射를 完了한 試驗管에서 菌의 懸濁液을 pipet 로서 一定量式取하여 T.G.Y. media 또는 Malt extract media의 agar plate에 培養하고 生育하는 Colony를 Quehec's colony counter 로서 算定하였다.

5. 藥劑의 投與法; D.H.A와 vitamin K<sub>3</sub>는 Sodium 鹽을 使用하였으며, Nitrofurazon과 Sorbic acid는 各各 Table. 4, 5와 같이 使用하였다. 酵母菌에 對한 實驗에 있어서는 L.D.<sub>50</sub>의 量을 事前

에 豫備實驗을 通하여 Probit 法으로서 算出하였다. (Table. 4)

6. 培地의 組成; *Lactobacillus* 및 yeast에 對한 培地의 組成은 Table 1, 2, 3과 같다.

**Table. 1.** Constituents of (A) media for yeast.

Glucose	1.0%
Peptone	1.0%
Potassium phosphate	0.5%
Magnesium sulphate	0.1%
Malt extract	1.0%
(Agar agar	2.0%)
Distilled water	97 c.c.
Total	100 c.c.
p.H.	5.7

**Table. 2.** Constituents of (B) media for yeast.

Glucose	0.5%
Peptone	0.5%
Potassium phosphate	0.25%
Magnesium sulphate	0.1%
Malt extract	0.5%
Distilled water	98 c.c.
Total	100 c.c.
p.H.	5.8

**Table. 3.** Constituents of media for *Lactobacillus*.

	(C)	(D)
Tryptone	2.0%	1.0%
Glucose	2.0%	1.0%
Yeast extract	0.5%	0.25%
Sodium chloride	0.6%	0.3%
Tomato juice	0.1%	0.05%
(Agar 2.0%)		
Distilled water	95 c.c.	98 c.c.
Total	100 c.c.	100 c.c.
p.H.	6.8	

**Table. 4.** L.D.<sub>50</sub> of chemicals against yeasts.

Chemicals	L.D. <sub>50</sub> (g/100 c.c.)
Sorbic acid	0.0123
Vitamin K <sub>3</sub>	0.00074
Sodium dehydroacetic acid	0.0057
P-oxybutyl benzoate	0.0047

**Table. 5.** The added doses of chemicals against *Lactobacillus*.

Chemicals	Doses (g/100 c.c.)
Sorbic acid	0.005, 0.05, 0.5. each.
Nitrofurazone	0.00005, 0.0005, 0.005. each.
Sodium dehydroacetic acid	0.001, 0.01, 0.1. each.

放射線照射時의 試驗管内 培地濃度는 培養에 보다는 稀釋하여 使用하였다. (Table. 2, 3) 이것은 培地成分의 保護의 干涉을 節減시키 기위해서 였다.

### 實驗結果 및 考察

酵母菌의 生殘率에 對한 放射線單獨照射區와 放射線과 化學藥劑와의 併合處理區의 影響은 Fig. 1 과 같다. 即 放射線과 化學藥劑와의 併合處理는 放射線單獨處理에 比하여 懸隔한 差異를 보여주고 있으며 前者의 境遇는 殺菌效果를 나타내고 있다.

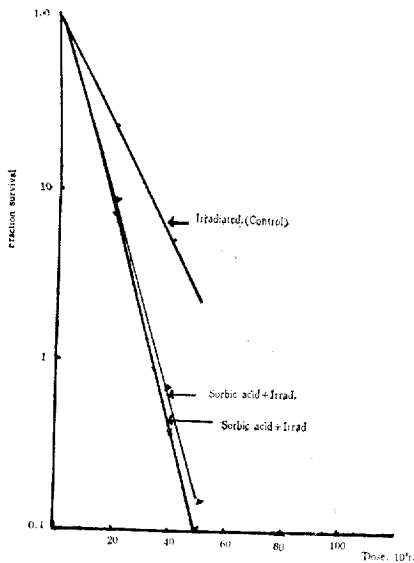


Fig. 1. Synergistic action of sorbic acid for *Sacch. cerevisiae* on radiation sterilization (1)  
(•); gamma irradiated,  
(△); sorbic acid (0.12 mg/c.c.) and gamma irradiated,  
(×); sorbic acid (0.152 mg/c.c.) and gamma irradiated.

Fig. 2는 放射線만을 照射한 Control區와 放射線과 sorbic acid를 併合處理한 區와의 比較이다. 同量의 sorbic acid 處理를 하였더라도 放射線量이 增加함에 따라서 殺菌效果는 增加한다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 同線量에서는 sorbic acid의 增加에 따라서 殺菌效果는 增加한다. 따라서 sorbic acid는 放射線의 殺菌作用에 協力的으로 作用함을 알 수 있다.

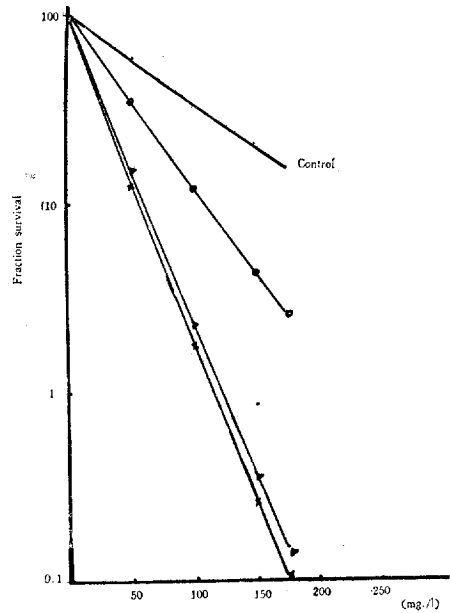


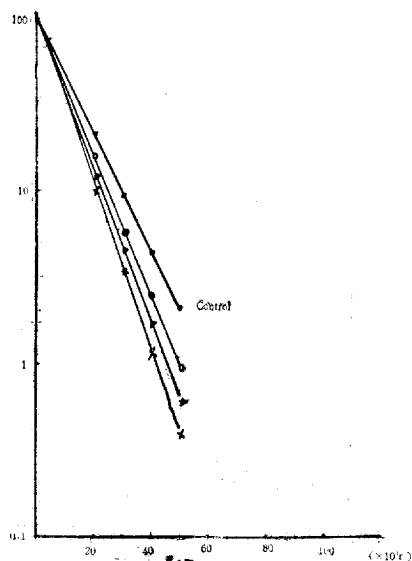
Fig. 2. Synergistic action of sorbic acid for *Sacch. cerevisiae* on radiation sterilization. (2)  
(•); sorbic acid alone,  
(○); sorbic acid and gamma irradiated of  $10 \times 10^4$  r.  
(△); sorbic acid and gamma irradiated of  $20 \times 10^4$  r.  
(×); sorbic acid and gamma irradiated of  $30 \times 10^4$  r.

vitamin K<sub>3</sub> (Menadion)의 作用은 Fig. 3과 4에서 보는 바와 같다. 그 生殘率의 모양은 sorbic acid의 境遇와 同一하다.

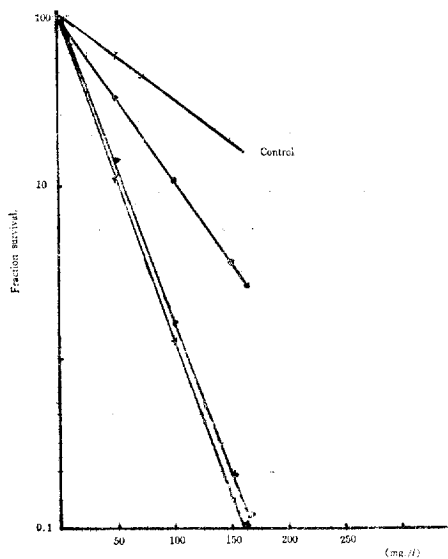
sorbic acid와 K<sub>3</sub>의 殺菌協力效果는 甚大하며 그 程度는 大略 같다. Dehydroacetic acid (D.H.A.)의 效果는 Fig. 5 및 6에서 보는 바와 같다.

P-oxybutylbenzoate(P.O.B.B.)의 效果는 Fig. 7 및 8에서 보는 바와 같다. D.H.A와 P.O.B.B.의 두 藥品에 있어서는 그 殺菌效果가 前者의 sorbic acid와 K<sub>3</sub>에 未及하지 마는 殺菌協力效果가 있음을 알 수 있다.

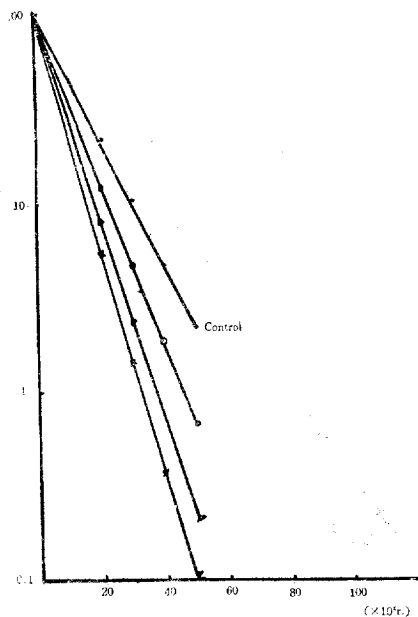
G.K. York(1964)가 報告한바 있는 sorbic acid의 生育阻害作用이 微生物細胞의 oxidative phosphorylation 및 sulfhydryl enzyme의 抑制라고 한다면, 放射線과 sorbic acid의 協力的 殺菌作用은 細胞의 生理代謝와 密接한 關係가 있을 것으로 思料된다. 한편 放射線이 cysteine과 같은 SH-化合物에 依하여 그 障害가 除去되는 事實은 Sorbic acid에 있어서도 同一하다. 이러한 類同點은 放射線의 細胞生理



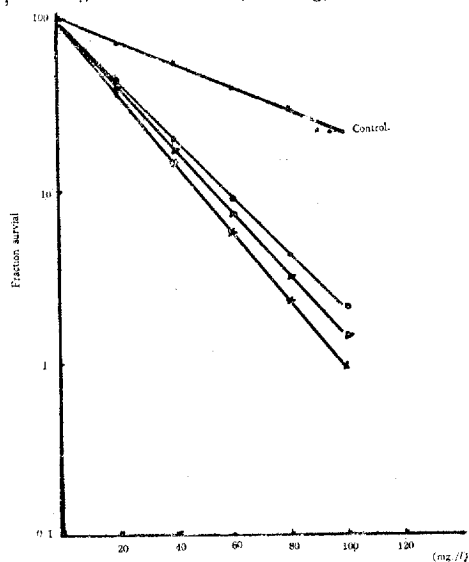
**Fig. 3.** Synergistic action of vitamin K<sub>3</sub> for *Sacch. cerevisiae* on radiation sterilization. (1) (•); K<sub>3</sub>(0.0074 mg/c.c.) and gamma irradiated. (Δ); " (0.0104 mg/c.c.) and gamma irradiated. (×); " (0.016 mg/c.c.) and " "



**Fig. 4.** Synergistic action of vitamin K<sub>3</sub> for *Sacch. cerevisiae* on radiation sterilization (2) (•); Vitamin K<sub>3</sub> only alone, (○); K<sub>3</sub> and gamma irradiated of  $10 \times 10^4$  r. (Δ); K<sub>3</sub> and gamma irradiated of  $20 \times 10^4$  r. (×); K<sub>3</sub> and gamma irradiated of  $30 \times 10^4$  r.



**Fig. 5** Synergistic action of sodium dehydroacetate for *Sacch. cerevisiae* on radiation sterilization (1) (•); gamma irradiated alone, (○); gamma irradiated and 0.057 mg/c.c. of D.H.A treated. (Δ); " and 0.075 mg/c.c. " (×); " and 0.098 mg/c.c. "



**Fig. 6.** Synergistic action of sodium dehydroacetate for *Sacch. cerevisiae* on radiation sterilization. (•); Sod. D.H.A. alone treated, (○); " and gamma irradiated ( $10 \times 10^4$  r.) (Δ); " and " ( $20 \times 10^4$  r.) (×); " and " ( $30 \times 10^4$  r.)

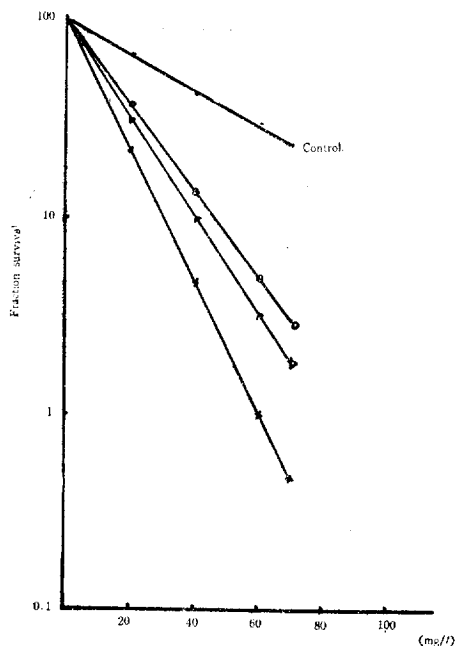


Fig. 7. Synergistic action of p-oxybutylbenzoate for *Sacch. cerevisiae* on radiation sterilization. (1)

(•); gamma irradiated alone,  
(Δ); P.O.B.B.(0.047 mg/ c.c.) and gamma irradiated.  
(×); " (0.058 mg/c.c.) and "

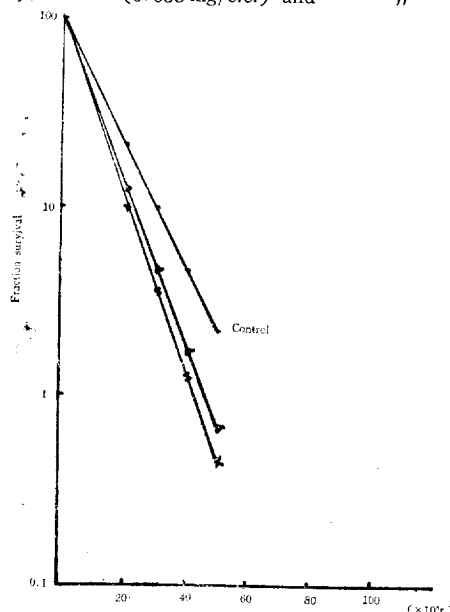


Fig. 8. Synergistic action of p-oxybutylbenzoate for *Sacch. cerevisiae* on radiation sterilization. (2)

(•); P.O.B.B. treated alone,  
(○); " and gamma irradiated( $10 \times 10^4$  r.)  
(Δ); " and " ( $20 \times 10^4$  r.)  
(×); " and " ( $30 \times 10^4$  r.)

學的効果를 分析하는데 있어서 어떤 資料를 提供하는 것 같다.

한편 D.H.A.의 生育阻害機作(Nomoto, 1954)은 好氣的狀態下에서는 cyclophorase enzyme system을 阻害하고 嫌氣的狀態下에서는 Glycolysis 以外の 代謝系를 阻害한다고 하며, 그後에 알려진바로는 D.H.A.는 嫌氣的解糖과 磷酸代謝와의 共軛을 解除하고 有機磷酸化合物의 生成과 蓄積을 阻害하는 "Uncoupler"의 役割을 한다고 한다.

D.H.A와 放射線과의 殺菌協力作用은 Sorbic acid나 또는 vitamin K<sub>3</sub>의 添加에 보다는 顯著하게 微弱하다. 따라서 Sorbic acid와 放射線과의 協力作用은 D.H.A 보다 크며, 相互連關性이 깊은 것으로 思料된다.

vitamin K<sub>3</sub>의 添加에 있어서도 그 効果는 sorbic acid와 同等하다(Fig. 3, 4 參照)

P-oxybutylbenzoate는 協力作用이 微弱하나 若干 있었다.(Fig. 7, 8). 그러나 生殘菌數가 많았으므로 殺菌效果를 거두었다기 보다. 生育阻害作用으로 보는 것이 妥當하다.

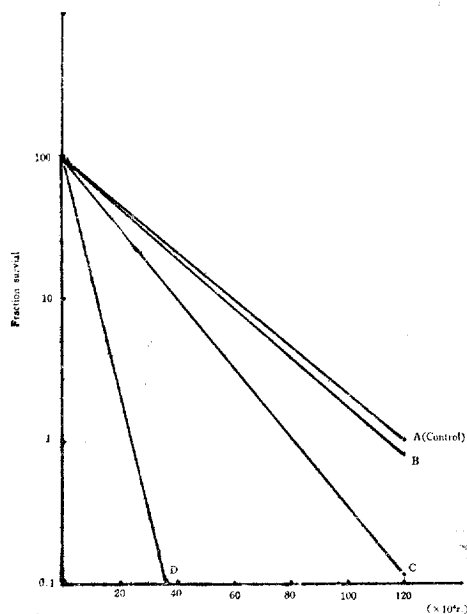


Fig. 9. Synergistic action of sorbic acid for *Lact. plantarum* on radiation sterilization. (1)

(A); Control, only irradiated.  
(B); Sorbic acid(5 mg/100 c.c.) treated and irradiated.  
(C); Sorbic acid(50 mg/100 c.c.) treated and irradiated.  
(D); Sorbic acid(500 mg/100 c.c.) treated and irradiated.

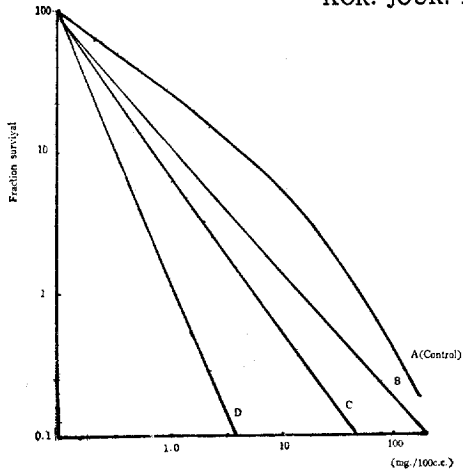


Fig. 10. Synergistic action of sorbic acid for *Lact. plantarum* on radiation sterilization. (2)

- (A); Sorbic acid only, but without irradiation.  
 (B); Sorbic acid irradiated. ( $40 \times 10^4$  r.)  
 (C); Sorbic acid and irradiated. ( $80 \times 10^4$  r.)  
 (D); Sorbic acid and " ( $120 \times 10^4$  r.)

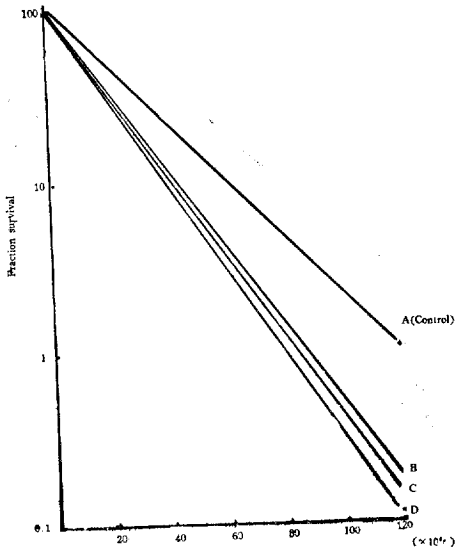


Fig. 11. Synergistic action of Dehydroacetic acid for *Lact. plantarum* on radiation sterilization. (1)

- (A); Control, only irradiated.  
 (B); D.H.A. (1 mg/100 c.c.) treated and irradiated.  
 (C); " (10 mg/100 c.c) "  
 (D); " (100 mg/100 c.c) "

乳酸菌에 대한 藥品의 影響은 Fig. 9, 10, 11, 12, 13, 14 와 같다.

Fig. 9, 10 에서 보는 바와같이 sorbic acid 의 添

加量이 增加함에 따라서 菌의 生殘率은 急激히 低下하고 0.5%의 濃度에 있어서는 致死線量의 1/3인  $40 \times 10^4$  rentgen 으로서 殺菌效果를 거두었다. Fig. 10 은 X-軸에 sorbic acid 의 添加量을 잡고서 Fraction survival 을 보았다. 生殘率의 減少는 Fig. 9 의 結果를 더욱 뒷바침하였다.

Fig. 11 에서 보는바와 같이 Dehydroacetic acid

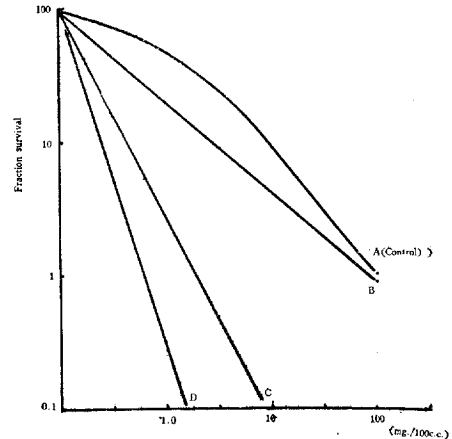


Fig. 12. Synergistic action of Dehydroacetic acid for *Lact. plantarum* on radiation sterilization. (2)

- (A); D.H.A treated only. (Control)  
 (B); D.H.A treated and irradiated ( $40 \times 10^4$  r.)  
 (C); " ( $80 \times 10^4$  r.)  
 (D); " ( $120 \times 10^4$  r.)

以下(D·H·A)의 影響을 分析하면은 100 c.c.當 1 mg 에서 100 mg 까지는 거의 같은 程度로 生殘率이 보였으나, Fig. 12 는 그와는 조금 달라서 C,D,의 添加量(10 mg, 100 mg)에서 相當한 生殘率의 低下를 볼수있다. 即 1 mg/100 c.c 의 D.H.A 添加는 別로 影響을 주지 않았으나, 10 mg 以上の 使用에서는 相當한 生殘率의 減少가 뚜렷하였다. 乳酸菌에 對해서는 D.H.A 가 靜菌作用을 나타내지 못한다고報告되어 있으나(Nomoto, 1954) 放射線과의 併用에서 殺菌作用을 나타 낸은 細胞代謝에서 어떤 變化가 일어난 것으로 思料하며 興味있는 問題이다.

Fig. 13 및 14 에서 보는 바와같이 0.5 mg/1,00 c.c. 以上에서 殺菌의 協力現象이 일어났으며, D. H.A.의 경우와 비슷하였다.

以上の 實驗結果는 營養이 豊富한 T.G.Y. 培地에서 放射線을 照射한 만큼, 一般의인 生理食鹽水溶液內라든가 또는 Buffer solution 內에 照射한 것

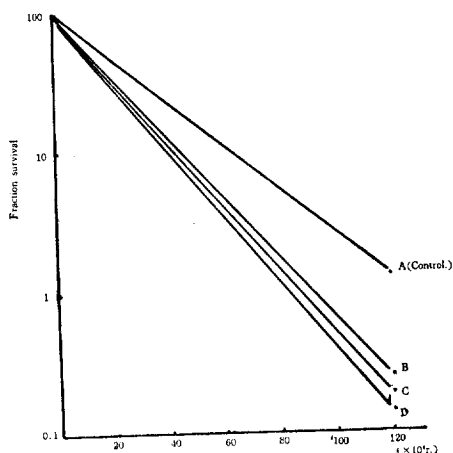


Fig. 13. Synergistic action of nitrofurazone for *Lact. plantarum* on radiation sterilization.(1)

- (A); Control, irradiated only.  
 (B); Nitrofurazone (0.05 mg/1,000 c.c.) treated and irradiated.  
 (C); Nitrofurazone (0.5 mg/1,000 c.c.) treated and irradiated.  
 (D); Nitrofurazone (5 mg/1,000 c.c.) treated and irradiated.

파는 死滅率이 다르다. 即 Frazier(1960)가 記載한 食品微生物의 Killing doses 보다는 높다. 이點은 사용된 培地の 營養分 때문임을 알았다 (Lee, Kim, 1967)

大體로 이와같은 化學藥品은 現行의 食品保存劑 (Food preservatives)들로서 人體에 無害한 것이다.

이들 藥品은 또한 選擇의 作用으로 微生物의 metabolism 을 阻害하여 發育을 阻止하는 作用이 있음으로

#### 摘

*Saccharomyces cerevisiae* 및 *Lactobacillus plantarum* 의 放射線感受性에 미치는 Sorbic acid, vitamin K<sub>3</sub>, Dehydroacetic acid, P-oxybutyl benzoate, 및 Nitrofurazone 의 致死協力現象을 研究하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

- 1) 酵母菌의 放射線感受性中 致死率은 Sorbic acid, Vitamin K<sub>3</sub>에 의하여 協力的으로 增加되었으며, Sodium-dehydroacetate 와 P.O.B.B. (P-oxybutyl benzoate) 는 若干 弱하나나 協力的致死作用을 나타내었다.
- 2) 乳酸菌의 放射線에 의한 致死率은 Sorbic acid, Sodium-dehydroacetic acid 및 nitrofurazone 등에 의하여 協力的으로 增加 되었다.
- 3) 放射線 照射時의 微生物의 營養의 環境은 致死線量을 크게 支配하고 있다.

#### References

1. Brown, W.L., et al, 1960, The influences of low level gamma-irradiation antibiotic treatment,

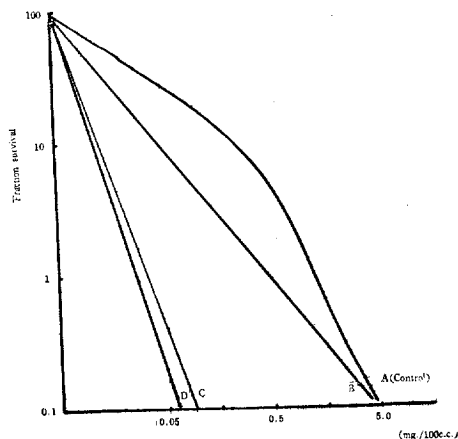


Fig. 14. Synergistic action of nitrofurazone for *Lact. plantarum* on radiation sterilization.(2)

- (A); Control, only irradiated.  
 (B); Nitrofurazone treated and irradiated ( $40 \times 10^4$  r.)  
 (C); " and " ( $80 \times 10^4$  r.)  
 (D); " and " ( $120 \times 10^4$  r.)

藥品의 Antimetabolic action 과 放射線의 阻害作用이 協力的으로 일어나는것으로 思料된다.

따라서 이러한 殺菌協力作用은 食品및 醫藥品等의 殺菌過程에 있어서 可及의 低線量을 適用할 수 있으며 高線量 使用으로 因하여 派生되는 副作用을 防止하는 方法이 될수 있다.

앞으로 上記藥品들이 發揮하는 metabolic activity 에 對한 特異한 阻害作用(Nomoto, 1954, York, 1964)과 放射線의 代謝阻害作用과의 關聯性은 代謝面에서 檢討할 必要가 있는것으로 認는다.

#### 要

storage temperature and vacuum packing on flavour and bacterial changes in cured bacon; Food Technology, Vol. 14, no. 2.

2. Eldjarn, L., et al, 1960, Mechanisms of prot-

- ective and sensitizing action, Mechanisms in Radiobiology, Vol. 2. Academic Press, N.Y.
3. Koch, R., 1957, The problem and constitution of radiation-sensitizing agents, Proceedings of the fifth International Conference on Radiobiology, Stockholm, 1956.
  4. Lerke, P.A., 1960, Effects of electron beam irradiation on the microbial content of spices and teas; Food Technology, Vol. 14, no. 6.
  5. Matsuyama, A., 1966, Recent advances in food irradiation research in Japan; I.A.E.A./F.A.O. International Symposium on food irradiation, Karlsruhe, 1966.
  6. Meshitsuka, G., et al, 1963, Synergistic action of alkali halides on radiation sterilization of yeasts; Synergistic action of NaCl. Tokyo Isotope Center, Annual Report, Vol. 2, 1963.
  7. " " 1963, Synergistic action of alkali halides on radiation sterilization of yeasts: Comparison of synergistic action of alkali halides. "ibid", Vol. 2.
  8. Matsuyama, A., 1966, The present and future problems in food irradiation; Jour. of Japan Food Irradiation, Vol. 1, no. 1.
  9. Nomoto, M., et al, 1954, Studies on the mechanism of antimicrobial action of dehydroacetic acid. Jour. of Agr. Chem. Soc. of Japan.
  10. Yamazaki, K., and Oka, M., 1964, Synergistic action of salts of organic acids on radiation sterilization of yeast; Tokyo Isotope Research Center, Annual Report, Vol. 3.
  11. Wilson, G.D., et al, 1960, The use of antibiotics and gamma irradiation in the aging of steaks at high temperatures; Food Technology, Vol. 14, 3.
  12. York, G.K., et al, 1964, Mechanisms in the inhibition of microorganism by sorbic acid; Jour. of Bacteriology, Vol. 88, no. 2.
  13. Lee, K.B. and Kim, J.H., 1967, Studies on Radio-preservation of Korean food., Ann. Report of Atomic Energy Research Inst. of Korea. Vol. 7, 1967.